



SKALSJUKDOMAR OCH KNÄPPARLARVER I POTATIS

**I. Blastdödningsperiodens och -metodens inflytande på
förekomsten av skalsjukdomar**

**II. Drycore-symptom; Samband mellan knäpparlarver och
Rhizoctonia och effekt av olika betningsmedel**



Stefan Brorsson



Sveriges lantbruksuniversitet
Examensarbete inom agronomprogrammet

SKALSJUKDOMAR OCH KNÄPPARLARVER I POTATIS

I. Blastdödningsperiodens och -metodens inflytande på förekomsten av skalsjukdomar

II. Drycore-symptom; Samband mellan knäpparlarver och Rhizoctonia och effekt av olika betningsmedel

Nyckelord: blastdödningsperiod- och metod, skalsjukdomar, knäpparlarver, drycore, QPCR, pluggtest, gradering, utsädesbetning



Författare: Stefan Brorsson

Huvudhandledare: Ulla Bång, SLU

Biträdande handledare: Gunnel Andersson, SJV

Examinator: Kerstin Huss-Danell, SLU

EXAMENSARBETE I BIOLOGI, KURSKOD: EX0564, 30 HP, D-NIVÅ

SLU, Institutionen för norrländsk jordbruksvetenskap
Department of Agricultural Research for Northern Sweden

Umeå 2010

SAMMANFATTNING

Detta projekt är fokuserat på svensk matpotatisproduktion samt förbättrat växtskydd och livsmedelskvalité. I projektet ingår två fältstudier utförda på Gotland sommaren 2009 med inriktning på skalsjukdomar och knäpparlarver. Studie I handlar om blastdödningsperiodens och -metodens betydelse för angrepp av silverskorv, svartpricksjuka och lackskorv. Studie II är inriktad på bekämpningsstrategi av symptomet drycore.

Studie I

Denna studie avsåg att följa uppförökningen av olika skalsjukdomar med tiden efter blastdödning med hjälp av molekylära och biologiska tester. Olika blastdödningsmetoder jämfördes också. Silverskorv förekom endast i mycket liten omfattning. Svartpricksjuka och lackskorv ökade med tiden efter blastdödning. Blastdödningsmetoderna påverkade förekomsten av lackskorv där kemisk blastdödning enbart och i kombination med blastkrossning resulterade i en snabbare sjukdomsutveckling jämfört med kontrollen med obehandlad blast som nådde jämförbar omfattning först fem veckor efter de övriga behandlingarna sedan blasten visnat av naturliga orsaker. Liknande resultat har tidigare påvisats i utländska studier, men detta är första gången som händelseförloppet demonstreras i Sverige.

Försök att påvisa smitta med den molekylära metoden QPCR gav av olika anledningar inga tillförlitliga resultat. De biologiska metoderna med pluggtest utförd i november och okulär värgradering i mars-april efter normal lagring av potatisen gav samstämmiga analyssvar.

Studie II

Studien avsåg att belysa orsakssambandet mellan knäpparlarver och *R. solani* för utveckling av symptomet drycore samt att ge indikation på möjlig bekämpningsstrategi av skadegörarna. Betningsmedel mot knäpparlarver och/eller *R. solani* samt fällor för knäpparlarver användes.

I försöksfältet upphittades knäpparlarver både i marken och i penetrerade potatisknölar. De fällor som användes fungerade däremot inte, vilket medförde att populationstätheten inte kunde anges. I potatisen förekom symptom av drycore. I samtliga dessa som studerades i lupp förekom *Rhizoctonia*-mycel runt och inuti hålen. Detta stöder en utländsk studie att både *R. solani* och knäpparlarver behövs för utveckling av drycore. I studie I, som utfördes några mil därifrån, var *Rhizoctonia*-angreppet omfattande, men där fanns inga knäpparlarver i fältet och potatisen visade inte heller några symptom av drycore. Utsädesbetningarna med Monceren och Prestige gav högre skörd jämfört med övriga behandlingar vilket indikerar att dessa produkter kontrollerat utsädessmittan av *R. solani* och därigenom motverkat skördereducerande angrepp på stjälkar och stoloner.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INTRODUKTION	4
Bakgrund	4
Kort om skadegörarna	5
<i>Rhizoctonia solani</i>	5
<i>Helminthosporium solani</i>	6
<i>Colletotrichum coccodes</i>	7
<i>Agriotes</i> spp.	7
STUDIE I	8
Material och metoder	
Fältdata, försöksplan och provtagning	8
Biologisk analys	10
DNA-analys	10
Statistik	13
Pilotstudie – metodanalys	13
Resultat	13
Silverskorv, <i>H. solani</i>	14
Svartpricksjuka, <i>C. coccodes</i>	14
Lackskorv, <i>R. solani</i>	15
Diskussion	20
Silverskorv, <i>H. solani</i>	20
Svartpricksjuka, <i>C. coccodes</i>	20
Lackskorv, <i>R. solani</i>	21
DNA-analys	21
STUDIE II	22
Material och metoder	
Fältdata, försöksplan och provtagning	22
Analys	23
Statistik	24
Knäpparlarvfällor	26
Resultat	27
Drycore	27
Lackskorv och krokodilskinn	27
Brutto- och friskskörd	28
Knäpparlarvfällor	28
Diskussion	29
TACK TILL	31
REFERENSER	32

INTRODUKTION

BAKGRUND

Matpotatis odlas på ca 0,7 % av Sveriges åkerareal (SCB hemsida 2009-12-08) och är en av våra viktigaste livsmedelgrödor. Detta projekt innehåller två studier vilka syftar till att förbättra växtskyddet och kvalitén i matpotatisproduktionen. Studierna är inriktade på vanligt förekommande skadegörare i potatis, nämligen skalsjukdomar, inkluderande lackskorv, och knäpparlarver. Studie I fokuserar på blastdödningsperiodens (tiden mellan blastdödning och upptagning) och -metodens betydelse för angrepp av silverskorv (*Helminthosporium solani*), svartpricksjuka (*Colletotrichum coccodes*) och lackskorv (*Rhizoctonia solani*). Studie II behandlar det alltmer uppmärksammade symptom av *R. solani* som kallas drycore (Bång 2008) och där knäpparlarver visat sig vara inblandade (Keiser 2007).

Skalsjukdomar har fått stor ekonomisk betydelse med senare tids ökade krav på släta fina knölar utan missfärgning. I Storbritannien beräknas silverskorv och svartpricksjuka orsaka en årlig förlust på ca 5 miljoner pund i matpotatisproduktionen (British Potato Council 1998). Inga liknande uppskattningar är gjorda i Sverige, men säkert är att betydande ekonomiska vinster skulle kunna erhållas om skalkvalitén förbättrades.

Silverskorvens skadeverkan har länge varit känd medan angrepp av svartpricksjuka fram tills nu ofta har förbisetts. Svartpricksjuka har förmodligen ibland klassats som silverskorv pga. liknande angreppssymptom. I flera västeuropeiska rapporter har forskare länge försökt varna för svartpricksjukans uppförökning (Langerfelt 1985; Lees & Hilton 2003; Glais & Andrivon 2004) och på senare tid har samma budskap kommit från Ryssland (Zeiruk 2009) och Polen (Osowski 2009).

Blastdödningsperioden har stor betydelse för utvecklingen av kvalitetsnedsättande sjukdomar. Det är dokumenterat att förekomsten av silverskorv (Jouan *et al.* 1974) och lackskorv (Spencer & Fox 1978, 1979; Otrysko *et al.* 1988) ökar efter blastdödning. En senare upptagning försvårar dessutom möjligheten att motverka angreppen av silverskorv genom upptorkande sårsläkning s.k. dry curing (Hide & Boorer 1991). Sambandet mellan blastdödningsperiod och angrepp av svartpricksjuka är inte närmare utredd.

Även blastdödningsmetoden påverkar sjukdomsutvecklingen efter blastdödning. Användning av kemiska medel gynnar utvecklingen av lackskorv (Otrysko *et al.* 1988; Spencer & Fox 1978, 1979; Gudmestad *et al.* 1979). Detta beror på utsöndring av flyktiga exudat från knölarna i samband med att skalbildningen kommer igång (Dijst 1990) och förklarar varför metoder som luftar igenom jorden, som ryckning (Dijst 1985) och tvåstegsupptagning ”green crop harvesting” (Mulder *et al.* 1992), har motsatt effekt. Inga svenska studier har hittills belyst blastdödningsmetodens betydelse för utveckling av skalsjukdomar efter blastdödning.

Med biologiska och molekylära metoder kan växtpatogenernas smittonivåer uppskattas kvantitativt. Biologiska test såsom pluggtest är en äldre metod utvecklad av Hide *et al.* (1968). Denna metod ger ett pålitligt svar på förekomsten av silver-, lack- och blåsskorv samt

svartpricksjuka, men analysen tar drygt åtta dagar och silverskorv påvisas säkrast efter en tids lagring (2-3 månader). DNA-analys är en ny kvantitativ metod utvecklad av Cullen *et al* (2001) och har benämningen ”real-time quantitative (TaqManTM) PCR” (QPCR). DNA-analys med QPCR går fort (svar inom tre timmar) och kan detektera mycket små mängder av patogener. Diagnos kan ställas redan strax före upptagningen och ge ett snabbt svar på smittonivån. För närvarande pågår europeiska studier för att försöka utveckla DNA-baserade prognosmetoder. Sådana skulle utgöra ett bra verktyg för praktiskt jordbruk att anpassa skördemetoder och skördetider i kvalitetshöjande syfte och minska skördeförlusterna.

Studie I är en pilotstudie med syfte att demonstrera ökad smittonivå av skalsjukdomar med tiden efter blastdödning och visa sambandet mellan resultat från molekylära analyser av smittomängder vid upptagning och det praktiska utfallet påvisat i biologiska tester på knölar efter viss tids lagring. I studien ingår även att jämföra olika blastdödningsmetoder för att undersöka om det förekommer skillnader i uppförökning av svampsjukdomar efter blastdödning.

Studie II är en pilotstudie med syfte dels att påvisa orsakssamband mellan knäpparlarver och *R. solani* för uppkomsten av symptomet drycore, dels att visa vilka bekämpningsmedel som kan motverka detta symptom.

KORT OM SKADEGÖRARNA

Rhizoctonia solani

Rhizoctonia solani är en jord- och utsädesburen patogen som orsakar välkända symptom i form av groddbränna, filtsjuka och lackskorv. Angrepp på stoloner och stjälbaser, som gynnas av lång period mellan sättnings och uppkomst, kallas groddbränna och yttrar sig som mörkbruna frätskador och helt avsnörda växtdelar. Vid kraftiga stjälangrepp som försvårar vatten- och näringstransport kan luftknölar uppträda i bladvecken. Svampens perfekta stadium, filtsjuka (*Thanatephorus cucumeris*), uppträder under fuktiga fältförhållanden som en filtartad beläggning på nedre delen av stjälkarna. Angreppen under växtsäsongen leder ofta till missformade knölar samt förskjutningar i skördens storleksfördelning samt ibland till minskad avkastning. Lackskorv på knölar utgör svampens vilkroppar, sklerotier. De består av en tät ansamling av mycelvävnad med ett hårdare svart yttre skikt vilket gör dem motståndskraftiga mot uttorkning. Groddbränna, filtsjuka och lackskorv finns beskrivna i ett faktablad (Andersson 2001).

Sklerotierna kan under viss tid överleva i jorden. Svampen kan också leva saprofytiskt på växtrester av olika slag. Om potatis ingår ofta i växtföljden ökar risken för marksmitta avsevärt. Den avtar dock relativt snabbt, och 3-4 potatisfria år har visat sig vara tillräckligt för att marksmittan ska vara svår att påvisa enligt studier såväl i Sverige (Bång 2005) som i Alaska (Carling *et al.* 1986).

Förutom de ovan beskrivna välkända symptomen på plantor och knölar uppträder även grova nätmönstrade skalpartier på knölar, oftast i en svacka eller spricka, i samband med infektion

av *R. solani*. På svenska kallas detta populärt för ”krokodilskinn”, medan man i utländsk litteratur benämner symptomet ”nicht sortentypische Rauschaligkeit (sortotypisk grovskalighet)” (Radtke & Rieckmann 1990).

Ett annat symptom på knölar som blivit allt mer uppmärksammat under senare år är vad som på engelska kallas drycore. Något svenskt ord för detta symptom finns ännu inte. Symptomet liknar insektskador (gångar) och kan beskrivas som brunaktiga håligheter med en bredd på 3-6 mm. Man har känt till att symptomet är associerat till närvaro av *R. solani* och att det t.ex. kan uppstå då svampen utnyttjar sprängda lenticeller som inkörsport (Schwinn 1961, Radtke & Rieckmann 1990). Nyligen klargjordes i en schweizisk avhandling att *R. solani* kan utnyttja mekaniska ytliga skador av olika slag som inkörsport och orsaka drycore-symptom. För första gången visades då också att det finns ett tydligt samband mellan förekomsten av drycore och knäpparlarvskador i fält med smitta av *R. solani* (Keiser 2007).

Knäpparlarvskador i potatis har blivit allt mer vanliga i Sverige under senare år. Man kan därför misstänka att detta bidragit även till ökningen av drycore. Förekomsten av drycore borde kunna motverkas genom betning med syntetiska eller biologiska preparat mot antingen svampen *R. solani* eller knäpparlarver eller mot båda typerna av skadegörare. Hittills finns mycket få rapporter som utreder rätt val av bekämpningsinsats för att minska drycore-angrepp. I en svensk pilotstudie (Bång 2008) visades att *Rhizoctonia*-infektionen i skörden kraftigt reducerades då sättknölar med drycore betades med fungiciden Monceren FS 250. I studie II används betningsmedel mot knäpparlarver och/eller *R. solani* samt fällor för knäpparlarver i avsikt att belysa sambandet mellan dessa båda skadegörare och symptomet drycore samt indikera möjlig bekämpningsstrategi.

***Helminthosporium solani* (Silverskorv)**

Silverskorv är i huvudsak en utsädesburen sjukdom som orsakas av svampen *H. solani*. Potatisknölar infekteras genom att svampen tränger igenom skalet vid dess mognad i slutet av vegetationsperioden. Infektionen är svår att upptäcka tidigt efter upptagning, men under lagring utvecklas silverfärgade fläckar på knölna. Med tiden växer fläckarna ihop och bildar större nekrotiska fläckar som dock begränsas till skalet. Skadade partier förlorar vätska och vid kraftiga angrepp skrumprar knölna.

Spridning sker i form av konidieproduktion vid i huvudsak hög temperatur (optimum ca 20°C) och hög relativ fuktighet (RF=90-100%). Svarta konidier sitter på konidiebärare liknande små kvistar av enbuskar och syns tydligt under lupp. För ögat ger symptomen ett sotigt intryck av knölen. Stor risk för smittspridning finns i samband med upptagning och sortering. Utsädes roll som smittspridare avgörs av angreppets utbredning vid sättnig. Många små angrepp har större sporuleringskapacitet än stora sammanväxta fläckar. Kraftigt infekterade sättknölar (ca 60% eller mer av ytan) ger senare uppkomst, stör tillväxten och minskar avkastningen. Angrepp av silverskorv blir större på lätta sandjordar jämfört med tyngre jordar. Stigande mullhalt minskar angreppen pga. ökad mikrobiell aktivitet. Bevattnig och blöta markförhållanden leder till minskad förekomst av silverskorv. Silverskorv kan bekämpas på

flera sätt med bland annat kemisk bekämpning, dofter från växtriket och ”dry curing”. Silverskorv finns beskriven i ett faktablad (Bång 2001).

***Colletotrichum coccodes* (Svartpricksjuka)**

Svartpricksjukan, orsakat av *Colletotrichum coccodes*, kan infektera samtliga delar av plantan. Infektion yttrar sig genom primärt angrepp på stjälkbasen för att därefter spridas till stolonerna, knölar och rötter. Symptomen på knölar utvecklas under lagring och liknar silverskorvens med silverskimrande fläckar. Svartpricksjukans fläckar är dock mer diffust avgränsade mot frisk skalvävnad. Sjukdomen leder liksom silverskorv till viktförluster under lagring p.g.a. vattenavgång genom skadat skal.

Spridning sker med konidier som sitter samlade i små svarta konidiebehållare (acervuli), nedsänkta i epidermis. Ur dessa sticker små mörka borst (setae) ut, vilka tydligt syns under lupp. Efter en tid omvandlas acervuli till vilkroppar (sklerotier). Svartpricksjukan sprids liksom silverskorv med infekterat utsäde, men överlever också i marken som sklerotier på bl.a. potatisrester. Sklerotierna överlever minst ett år och troligtvis längre tid på angripet plantmaterial. Rapporter visar att angreppen av svartpricksjuka ökar vid bevattning och blöta markförhållanden. Det finns ännu inget effektivt sätt att bekämpa svartpricksjukan. Det finns en utförlig review över *C. coccodes* (Lees & Hilton 2003) och skadegöraren ingår i faktabladet om silverskorv (Bång 2001).

***Agriotes* spp. (knäppare)**

I Sverige förekommer omkring 80 arter av knäppare, men endast ett fåtal orsakar skador på odlade grödor. De vanligaste skadegörarna är randiga sädesknäpparen (*Agriotes lineatus*), mörka sädesknäpparen (*Agriotes obscurus*) och mindre sädesknäpparen (*Agriotes sputator*).

Som tidigare nämnts orsakar larverna skador på potatisknölar, där de gnager gångar. Larverna är från början vita eller genomskinliga med längden 1-3 mm och övergår med tiden till en gul/gulbrun färg och blir upp till 20 mm långa. Kroppen på äldre larver är cylindrisk och har ett hårt glänsande skinn. På huvudet finns två mörkbruna käkar och framtill på kroppen sitter tre par korta ben. Karaktäristisk för *Agriotes* spp. är att sista kroppssegmentet är konformat. Knäpparlarverna växer långsamt och lever i jorden 3-4 år eller längre innan de utvecklas till fullbildade skalbaggar.

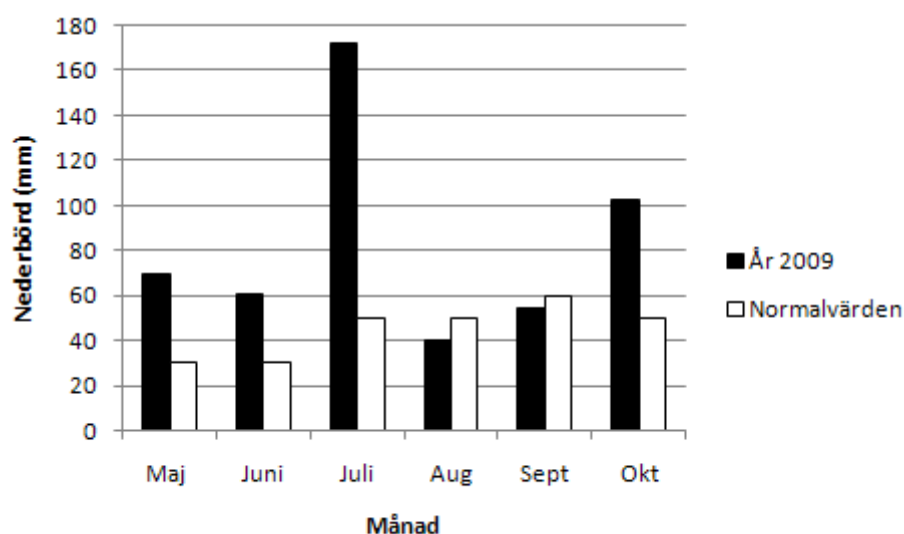
En utländsk studie (Parker & Seeney 1997) visar att vallodling ökar knäpparlarvförekomsten i fältet. Minskad jordbearbetning, gräsfånggrödor, bevuxna trädor och ensidiga stråsädesväxtföljder bidrar också till ökad förekomst av knäpparlarver. Mer utförlig redogörelse om skadegöraren återfinns i ett faktablad (Nilsson 1995).

STUDIE I Blastdödningsperiodens och –metodens inflytande på förekomsten av skalsjukdomar

MATERIAL OCH METODER

Fältdata, försöksplan och provtagning

Denna studie pågick under 2009, då ett fält valdes ut i samråd med en odlare på Gotland. Avsikten var att utföra studien i en sort och på ett fält där stora problem med silverskorv ofta förekom. På grund av onormalt mycket nederbörd i juli (Figur 1), med översvämningsskador som följd, flyttades emellertid försöket till en ny plats. Förutsättningarna blev därför inte optimala med avseende på silverskorvangrepp på potatisknölarna. Utsädet betades med Prestige som är en kombinerad fungicid/insecticid. Fältdata beskrivs i Tabell 1.



Figur 1. Nederbördsdata. Svarta staplar visar nederbörden i Fole (Gotland) för odlingssäsongen 2009. Vita staplar visar nederbörden på Gotland för en 30-årsperiod (1961-1990) (SMHI hemsida 2010-01-13).

Tabell 1. Fältdata

Gård	Stora Tollby Gård (Fole)
Gröda	Potatis
Sort	Ampera
Sättdatum	6 maj 2009
Förfrukter	Vårkorn, potatis, vårvete, potatis
Jordart	Måttligt mullhaltig Mo

Behandlingarna bestod av två olika blastdödningsmetoder och en obehandlad kontroll (Tabell 2). Reglone (Syngenta Crop Protection A/S, Köpenhamn, Danmark) har Dikvat dibromidsalt, (374 g l^{-1}) som verksamt substans. Fältförsöket var ett randomiserat blockförsök med fyra upprepningar. Rutstorleken var $5,4 \times 2 \text{ m}$ inkluderande sex potatisrader där de två yttersta utgjorde skyddsradar.

Tabell 2. Försöksplan

Led	Behandling (23 aug)	Dos Reglone (l/ha)
A	Obehandlat	-
B	Blastkrossning + Reglone	2
C	Reglone	4

Provtagning av potatisknölar från försöksfältet utfördes oftast var fjärde dag med start 27 augusti och fortgick till 7 oktober. Två knölprover, ett större och ett mindre, togs ut från varje ruta vid varje provtagningstillfälle. I tillägg togs ett prov med fem knölar per ruta den 19 augusti, fyra dygn före blstdödningsstillfället.

Det mindre provet bestod av 15 knölar från fyra slumpvist utvalda stånd. Dessa användes till två typer av analyser för detektion av skadegörare, QPCR och pluggtest. Dessa 15 knölar tvättades under rinnande kranvatten samma dag på Hushållningssällskapets försöksgård Hallfreda. Till analysen med QPCR togs därefter en skalremsa runt varje knöl över kron- och navelände med hjälp av potatisskalare (Figur 2). Remsorna placerades i plastpåsar och frystes (-20°C). De sändes senare med frysfrakt till SLU, Inst. för skoglig mykologi och patologi, för analys med QPCR. Samma 15 tvättade knölar med bortskalade remsor placerades i rena papperspåsar i kyl och sändes snarast till SLU, Inst. för norrländsk jordbruksvetenskap, där de fortsatt kylförvarades vid 5 °C tills de analyserades med pluggtest. Pluggtesterna utfördes rutvis ett block i taget och påbörjades i slutet av oktober. De sista analyserna avlästes i slutet av november.

Det större knölprovet bestod av kvarvarande knölar från de fyra stånden, 3-5 kg. Dessa placerades i öppna plastpåsar i nätsäckar i gårdens lagerhus för att graderas med avseende på synliga skador efter en lagringsperiod. Knölarna sändes i mars 2010 till SLU, Inst. för norrländsk jordbruksvetenskap, för analys i form av okulär gradering.

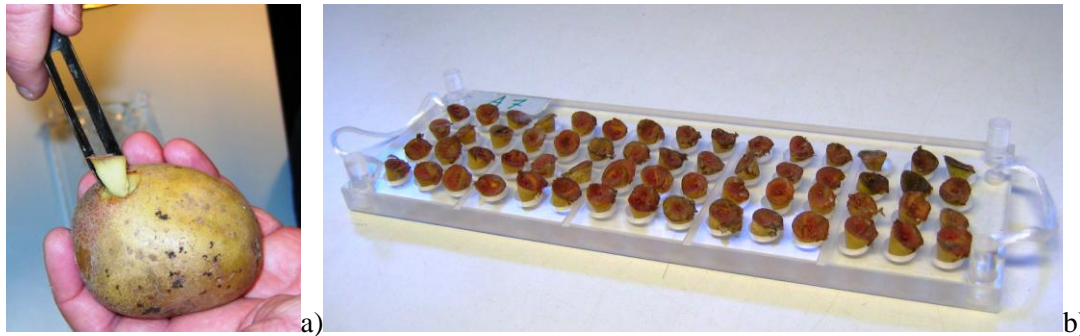


Figur 2 a) och b). En remsa skalades över kron- och navelände från varje knöl. Foto: a) Ulla Bång, b) Stefan Brorsson

Biologiska analyser

Pluggtest

Potatisknölarna analyserades enligt pluggtest modifierad efter Hide *et al.* (1968). Proverna som analyserades med pluggtest representerades av tolv fältprovtagningsdatum; 19 aug, 27 aug, 31 aug, 4 sep, 8 sep, 12 sep, 16 sep, 21 sep, 25 sep, 29 sep, 3 okt samt 7 okt. Tre aseptiskt utpreparerade pluggar från varje knöl i provet om 15 knölar (se ovan) placerades i specialkonstruerade brätten (Figur 3) och inkuberades fuktigt vid 15°C under åtta dagar. Pluggarna avlästes under lupp för registrering av skadegörarna, *R. solani*, *H. solani* och *C. coccodes*. Brätterna rengjordes mellan pluggtestkörningar genom att diskas i diskmaskin.



Figur 3 a) Frampreparering av plugg b). Pluggar placerade i brätten. Foto: Malin Barrlund

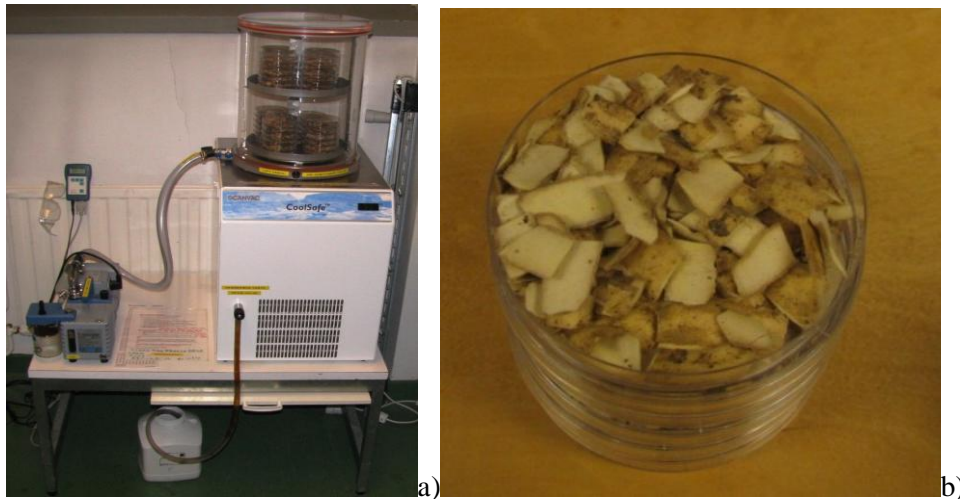
Vårgradering

Potatisknölarna storlekssorterades i fraktionerna <40 mm, 40-60 mm och >60 mm. Mittfraktionen graderades för synliga symptom av silverskorv och lackskorv, där knölarna vägdes och räknades i samtliga analyser. Knölarna graderades i fyra klasser med hänsyn till procentuellt angrepp på knölens yta, enligt friska (klass 0), ringa angrepp (1-5%; klass 1), måttligt angrepp (5-10%; klass 2) och rikligt angrepp (>10%; klass 3). Ett angreppsindex räknades ut genom att vikten i respektive angreppsklass multiplicerades med 0, 1, 2 eller 3 och dividerades med totala vikten för provet. Indexvärdena för symptomen kan därmed anta värden från 0-3.

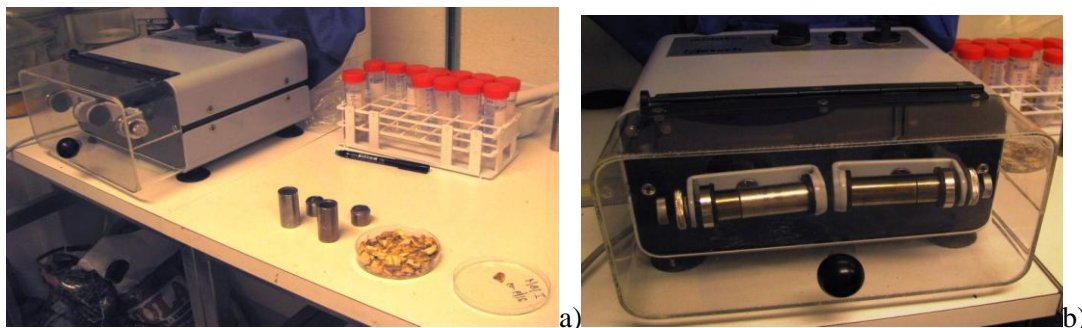
DNA-analys; Extraktion av total DNA och kvantifiering av patogener med QPCR

Homogenisering av prov

Det frysta provmaterialet från skalremsorna placerades i petriskålar och torkades i frystork (ScanVac CoolSafe™, Lyngby, Danmark) (Figur 4). Frystorkat material maldes till ett pulver i kulkvarn (Retsch, Haan, Tyskland) i 3 min (Figur 5). Varje frystorkat och malt prov representerade en försöksruta och ett specifikt provtagningsdatum. Malcylindrarna i kulkvarnen steriliserades mellan varje prov genom doppning i 70%-ig etanol med efterföljande bränning. Proverna förvarades i täta plaströr i frysen fram tills DNA-extraktion startade.



Figur 4 a) och b). Fryst provmaterial frystorkades i petriskålar. Foto: Stefan Brorsson



Figur 5 a) och b). Frystorkade bitar av potatisskal krossas i kulkvarn. Foto: Stefan Brorsson

DNA-extraktion

I ett Eppendorf-rör tillsattes 0,1 g malt prov och 1500 μ l extraktionsbuffert (3% CTAB, 2,6 M NaCl, 0,15 M TRIS-HCl (pH 8,0), 0,002 M EDTA). Röret placerades i värmeblock (65 °C, 60-120 min) och centrifugerades (13000 rpm, 5 min). Supernatanten (600 μ l) fördes över i nytt rör. Kloroform (1 volym) tillsattes och provet centrifugerades (10 000 rpm, 7 min). Övre fasen (500 μ l) överfördes till nytt rör, och kloroformbehandlingen repeterades. Övre fasen (400 μ l) blandades med 1,5 volym kall 2-propanol i nytt rör och placerades på is (30 min), följt av centrifugering (13 000 rpm, 10-15 min) för att fälla ut DNA. Supernatanten hälldes bort och pelleten tvättades med 200 μ l 70 %-ig etanol och centrifugerades (6500 rpm, 5 min). Supernatanten hälldes ut, pelleten torkades i rumstemperatur och resuspenderades med 50 μ l ultrarent vatten (milliQ). Samtliga DNA-prov renades med ett reningskit, JetQuick Spin Column Technique – PCR Purification (Qiagen, Solna) enligt tillverkarens instruktioner. De renade proverna koncentrerades bestämdes med spektrofotometer (Nanodrop ND 1000, Silverside, USA) och späddes med ultrarent vatten till en koncentration av 10 ng DNA/ μ l.

Proverna som utvaldes för DNA-extraktioner representerade sex fältprovtagningsdatum; 27 aug, 12 sep, 16 sep, 21 sep, 29 sep samt 7 okt. Från varje frystorkat och malt prov gjordes två extraktionsreplikater, a och b, som analyserades separat.

Standardlösningar bereddades från genomiskt DNA, extraherat ur mycel från rena vätskekulturer av *R. solani*, *H. solani* och *C. coccodes*. Extraktion och rening utfördes enligt processen beskriven ovan. Koncentrationen bestämdes med en Qubit fluorometer (Invitrogen AB, Lidingö). Spädningseriens volym var 500 µl och startkoncentration 0,125 ng DNA/µl för *C. coccodes* och *R. solani* och utfördes med 10-faldig spädning i fyra steg. *H. solani* hade startkoncentrationen 0,01 ng DNA/µl och utfördes med 10-faldig spädning i fem steg.

QPCR-analys

Smittan av *R. solani*, *H. solani* och *C. coccodes* kvantifierades med QPCR enligt beskrivning av Cullen *et al.* (2001, 2002) och Lees *et al.* (2002).

QPCR reaktioner kördes på ett *BioRad IQ 5*-instrument i 96-hålsplattor med 20 µl reaktionsvolym och samma program för alla primer-par: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, och 45 cykler av ett denatureringssteg (95 °C, 10 s) följt av ett kombinerat hybridisering-extensionssteg (60 °C, 1 min). Halva reaktionsvolymen bestod av "TaqMan® Universal PCR Master Mix, No AmpErase® UNG" (PE Applied Biosystems, Stockholm, Sverige). Taqman™ probe hade slutkoncentrationen 100 nM/reaktion och primers 300 nM/reaktion (Cybergene AB, Stockholm). Prober och primers för respektive patogen visas i tabell 3.

Tabell 3. Patogenernas prober och primers med primersekvens

Patogen	Prober & primers	Primersekvens (5' till 3')
<i>R. solani</i>	RQP1 ³	TTTAGGCATGTGCACACCTCCCTCTTTC
<i>R. solani</i>	RsTqF1 ³	AAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCTATTT
<i>R. solani</i>	RsTqR1 ³	AATTCCCCAACTGTCTCACAAGTT
<i>C. coccodes</i>	CcTqP1 ²	CGCAGGCGGCACCCCT
<i>C. coccodes</i>	CcTqF1 ²	TCTATAACCCTTTGTGAAACATACCTAACTG
<i>C. coccodes</i>	CcTqR1 ²	CACTCAGAAGAAACGTCGTTAAAATAGAG
<i>H. solani</i>	HsTqP1 ¹	TCGGAACCCTCTGTCTACCTGTACCACTTGTT
<i>H. solani</i>	Hs1F1 ¹	GTTTCAGCGGCCGCAAGGCT
<i>H. solani</i>	HsTqR1 ¹	TTCAGATACAAGGGTTTAAGGGATTC

¹Cullen *et al.* 2001

²Cullen *et al.* 2002

³Lees *et al.* 2002

I varje QPCR-analys ingick extraktionsprover, spädningsserie med standardlösningar, negativ kontroll samt kontroller för eventuell inhibition. Mängden extraktionsprov i varje QPCR-reaktion var 40 ng/brunn. Mängden standardlösningar var för *R. solani* och *C. coccodes* 0,5, 5, 50, 500 och 5000 ng/brunn och för *H. solani* 0,04, 0,4, 4, 40, 400 och 4000 ng/brunn. Inhibitionskontrollen bestod av ett standardlösningsprov från spädningsserien samt ett utvalt extraktionsprov som tillsattes. Varje reaktion utfördes i tre replikat på samma platta. För *R. solani* analyserades endast prover från två skördedatum, ett tidigt och ett sent.

Statistik

Faktorerna ”dagar efter blastdödning” och ”blastdödningsmetod” analyserades statistiskt med en tvåfaktoriell variansanalys (ANOVA). Medeltalsjämförelse gjordes vid $p \leq 0,05$ med hjälp av Fisher's LSD. QPCR-analysens extraktionsreplikat a och b jämfördes i ett t-test för att utreda sannolika skillnader mellan medelvärden. Programmet som användes för statistisk analys var NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Software, Kaysville, 84037 Utah, USA).

Pilotstudie – metodanalys

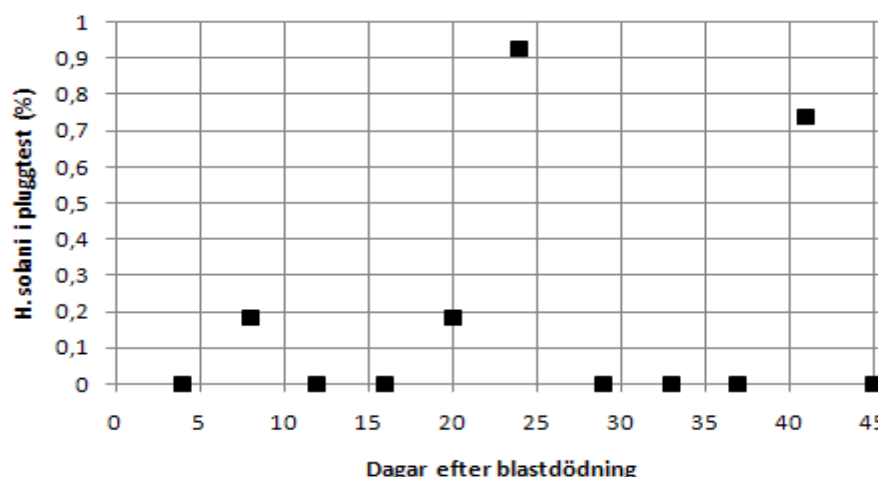
En mindre pilotstudie utfördes för att undersöka DNA-analysens och pluggtestets säkerhet i uppskattning av patogenförekomst. Metoderna testades på tolv knölar som hade synliga symptom av silverskorv. Knölarna graderades först visuellt med hänsyn till procentuellt angrepp av silverskorv på knölens yta, enligt ringa (1-5%), måttligt (5-10%) och rikligt (>10%) angrepp. Därefter testades samma knölars förekomst av *H. solani* med QPCR-analys och pluggtest. Skalremsor från samtliga knölar i respektive angreppsklass frystorkades och homogeniserades till ett prov som analyserades med QPCR. Fyra extraktionsreplikat analyserades separat för varje prov.

RESULTAT

Silverskorv, *H. solani*

DNA-analys och pluggtest

Båda analysmetoderna visade mycket låg förekomst och några skillnader i smitta beroende på blastdödningsperiod eller -metod fanns inte. Patogenförekomsten i pluggtest för olika provtagningstidpunkter, oavsett blastdödningsmetod, visas i Figur 6.



Figur 6. Förekomst av *H. solani* enligt pluggtest. Kvadrater visar medelvärden av prover (% infekterade pluggar) från respektive provtagningsdatum oavsett blastdödningsmetod ($n=12$).

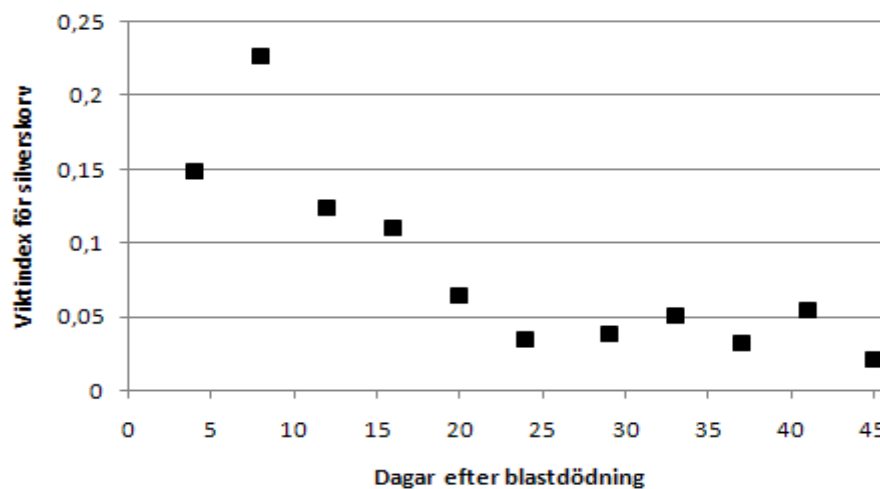
Vårgradering

Silverskorv förekom endast i liten omfattning och var svår att gradera på grund av det mycket kraftiga angreppet av lackskorv. Tvåfaktoriell variansanalys visade inte på något samspel mellan faktorerna ”dagar efter blastdödning” och ”blastdödningsmetod”. Faktorn ”dagar efter blastdödning” påverkade patogenförekomsten signifikant ($P < 0,001$) medan faktorn ”blastdödningsmetod” inte gjorde det. Patogenförekomsten vid olika provtagningstidpunkter, oavsett blastdödningsmetod, visas i Figur 7. Andelen infekterade pluggar för dag 4 skiljer sig signifikant från dag 20 och framåt. Den 8:e dagen skiljer sig signifikant från dag 12 och framåt (Fisher's LSD Comparison Test; $P \leq 0,05$, $n=12$).

Svartpricksjuka, *C. coccodes*

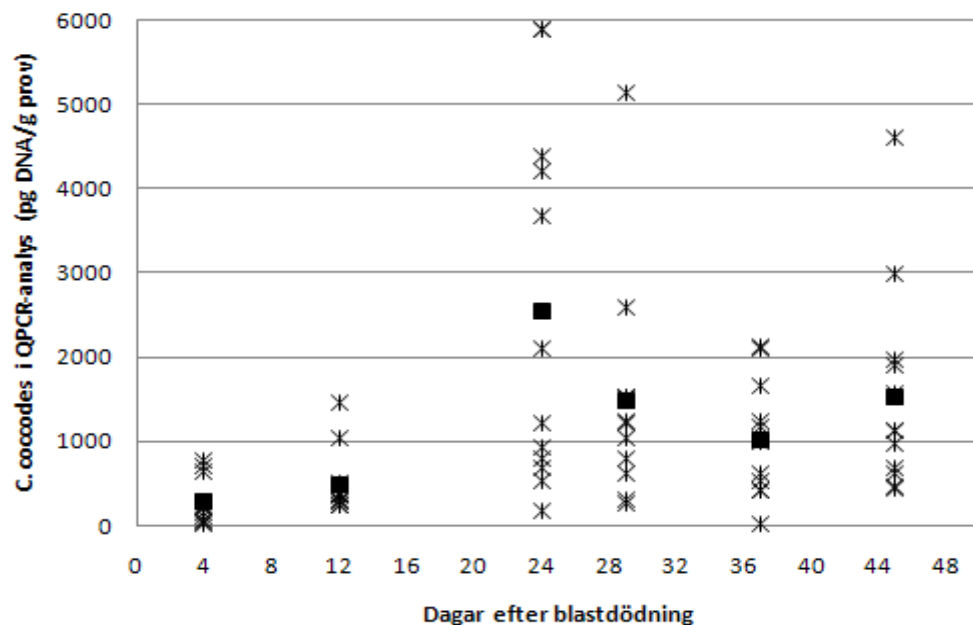
DNA-analys

Initialt undersöktes variationen inom varje prov. De två extraktionsreplikaten a och b skilde sig signifikant från varandra i 80% av fallen. Därför användes medelvärdet av dessa i de fortsatta beräkningarna. En tvåfaktoriell variansanalys visade att det inte fanns något samspel mellan faktorerna ”dagar efter blastdödning” och ”blastdödningsmetod”. Den första faktorn påverkade förekomsten av *C. coccodes* signifikant ($P < 0,001$) medan den senare inte gjorde det. Medelvärdet (pg DNA/g prov) för blastdödningsmetod A var 1100, för metod B 1470 och för metod C 1080. Patogenförekomsten vid olika provtagningstidpunkter, oavsett

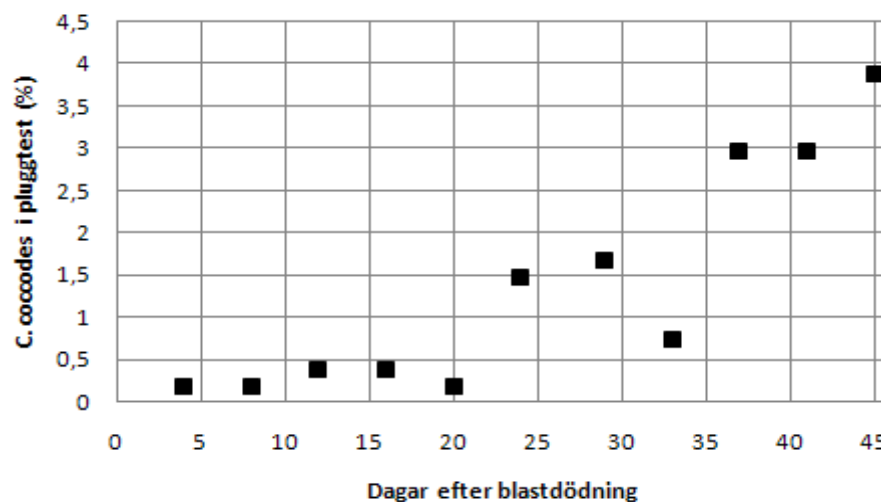


Figur 7. Förekomst av silverskorv (viktindex) enligt vårgradering efter lagring av knölprover. Kvadrater visar medelvärden av prover från respektive provtagningsdatum oavsett blastdödningsmetod ($n=12$).

blastdödningsmetod, visas i Figur 8. Mängden patogen-DNA för 4 och 12 dagar efter blastdödning skiljer sig signifikant från 24, 29 och 45 dagar efter blastdödning. Den 24:e dagen skiljer sig signifikant från dag 37 (Fisher's LSD Comparison Test; $P \leq 0,05$, $n=12$).



Figur 8. Förekomst av *C. coccodes* testad enligt DNA-analys. Kvadrater visar medelvärden av DNA-extraktioner vid respektive tidpunkt ($n=12$) medan stjärnor illustrerar enskilda rutvärden.

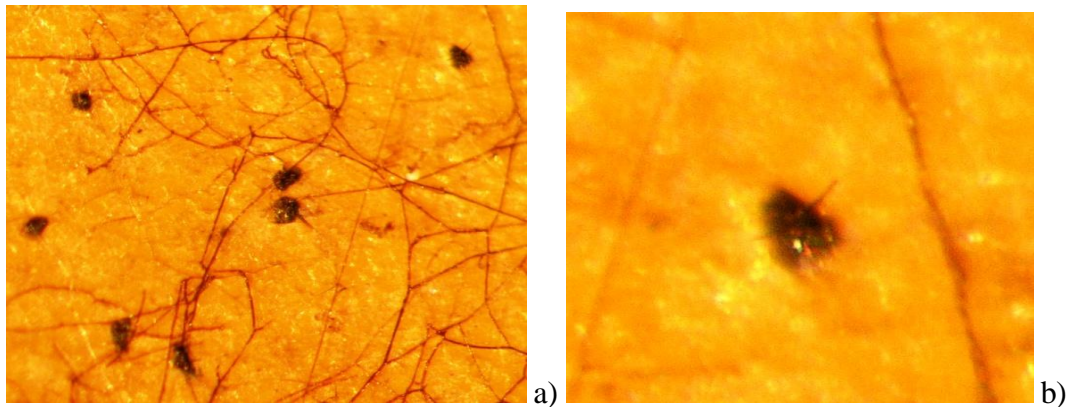


Figur 9. Förekomst av *C. coccodes* enligt pluggtest. Kvadrater visar medelvärden av prover (% infekterade pluggar) från respektive provtagningsdatum oavsett blastdödningsmetod ($n=12$).

Pluggtest

Den tvåfaktoriella variansanalysen visade att det inte fanns något samspel mellan faktorerna "dagar efter blastdödning" och "blastdödningsmetod". Den första faktorn påverkade patogenförekomsten signifikant ($P<0,001$) medan den andra inte gjorde det. Medelvärdet (% *C. coccodes*) för blastdödningsmetod A var 1,34, för metod B 1,06 och för metod C 1,34. Patogenförekomsten vid olika provtagnings tidpunkter, oavsett blastdödningsmetod, visas i Figur 9. Andelen infekterade pluggar för 4, 8, 12, 16, 20, 24, 33 dagar efter blastdödning skiljer sig signifikant från 37, 41 och 45 dagar efter blastdödning. Den 29:e dagen skiljer sig signifikant från dagarna 4, 8, 20 och 45 (Fisher's LSD Comparison Test; $P\leq 0,05$, $n=12$).

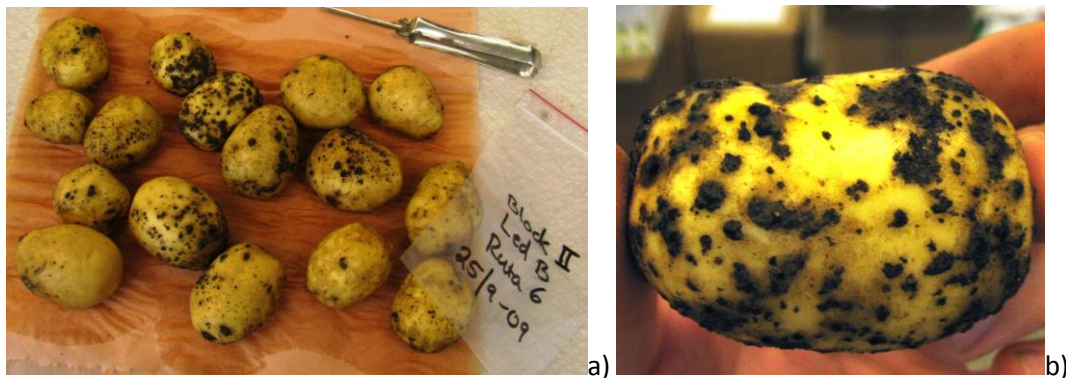
Figur 10 visar symptom på potatisknöl från pluggtest.



Figur 10. Symptom av *C. coccodes* och *R. solani* i pluggtest; a) acervuli av *C. coccodes* tillsammans med ett nätverk av *Rhizoctonia*-mycel, b) acervuli av *C. coccodes* med setae.
Foto: Stefan Brorsson

Lackskorv, *R. solani*

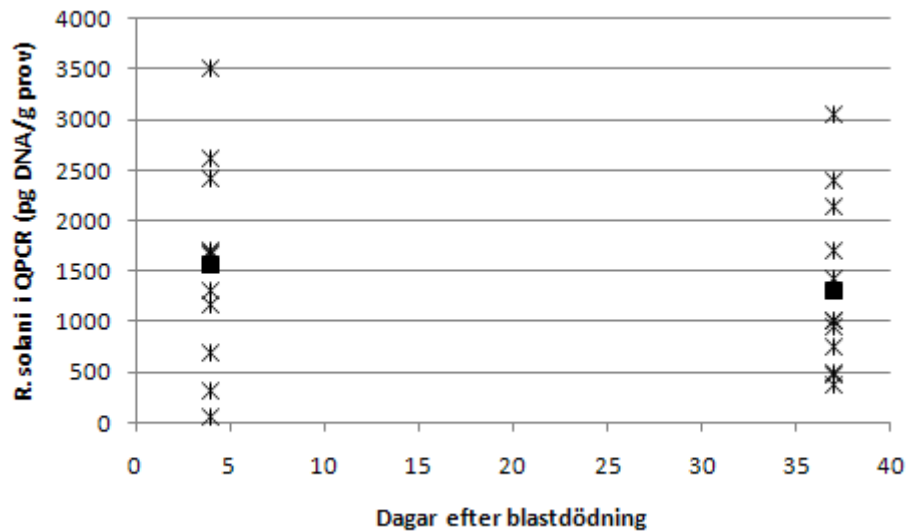
Angreppen av lackskorv var omfattande redan vid den första provtagningen. Figur 11 visar lackskorvsangrepp på knölar som togs upp den 25 september.



Figur 11 a) tvättat knölprov från 25 september b) kraftigt angrepp av lackskorv. Foto: Stefan Brorsson

DNA-analys

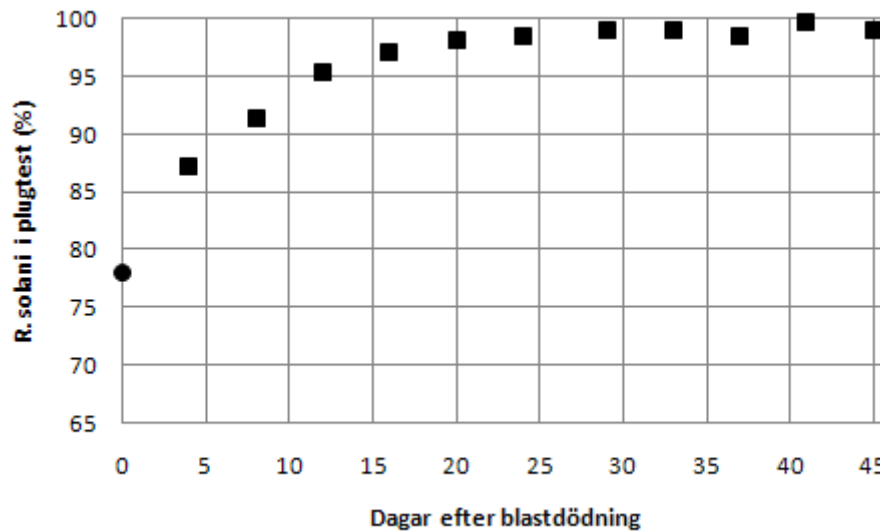
De två extraktionsreplikaten a och b skilde sig signifikant från varandra i samtliga fall. Därför användes medelvärdet av dessa i de fortsatta beräkningarna. Den tvåfaktoriella variansanalysen visade att det inte fanns något samspel mellan faktorerna "dagar efter blstdödningsmetod" och "blstdödningsmetod". Ingen av faktorerna påverkade förekomsten av *R. solani* signifikant. Medelvärdet (pg DNA/0,1g prov) för blstdödningsmetod A var 1550, för metod B 1720 och för metod C 1650. Patogenförekomsten vid två olika provtagningstidpunkter, oavsett blstdödningsmetod, visas i Figur 12.



Figur 12. Förekomst av *R. solani* testad enligt DNA-analys. Kvadrater visar medelvärde av DNA-extraktioner medan stjärnor illustrerar enskilda rutvärden ($n=12$).

Pluggtest

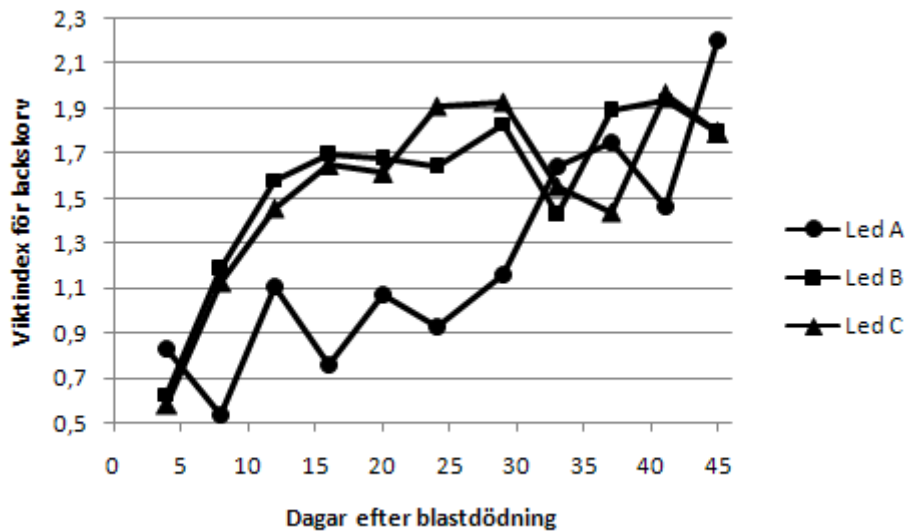
Andelen angripna pluggar var mycket omfattande redan vid de första provtagningstillfällena och ökade sedan successivt till närmare 100% efter drygt två veckor. Tvåfaktoriell variansanalys visade inget signifikant samspel mellan faktorerna ”dagar efter blasdödning” och ”blasdödningsmetod”. Första faktorn påverkade patogenförekomsten signifikant ($P<0,001$) men inte den andra. Medelvärdet (% *R. solani*) för blasdödningsmetod A var 86,9, för metod B 89,7 och för metod C 89,0. Patogenförekomsten vid olika provtagningstidpunkter, oavsett blasdödningsmetod, visas i Figur 13. Andelen infekterade pluggar från 4:e dagen efter blasdödning skiljer sig signifikant från dag 12 och senare, och den 8:e dagen skiljer sig signifikant från dag 20 och senare (Fisher’s LSD Comparison Test; $P\leq 0,05$, $n=12$). Medelvärdet från mindre prov med fem knölar från varje ruta, som uttagits den 19 augusti, 4 dagar före blasdödning, visas med en cirkel i figuren. Analysresultaten från denna tidpunkt har inte medtagits i beräkningarna.



Figur 13. Förekomst av *R. solani* enligt pluggtest. Kvadrater visar medelvärden av provresultaten (% infekterade pluggar) från respektive datum oavsett blastdödningsmetod och cirkeln visar värdet 4 dagar före blastdödning ($n=12$).

Vårgradering

Lackskorvsangreppet vid vårgraderingen var omfattande. Tvåfaktoriell variansanalys visade en tendens till samspel mellan faktorerna "dagar efter blastdödning" och "blastdödningsmetod", $P=0,068$, varför de olika behandlingarna redovisas separat i Figur 14. Båda faktorerna påverkade patogenförekomsten signifikant. Obehandlad blast resulterade i signifikant lägre viktindex för lackskorv jämfört med behandlingarna B och C, vilka påverkade sjukdomsutvecklingen på likartat sätt. Patogenförekomsten vid olika provtagningstidpunkter, oavsett blastdödningsmetod visar att 4:e och 8:e dagen efter blastdödning skiljer sig signifikant från dag 12 och senare. Dagarna 12, 16, 20, 24, 33 skiljer sig signifikant från dag 45 (Fisher's LSD Comparison Test; $P \leq 0,05$, $n=12$).

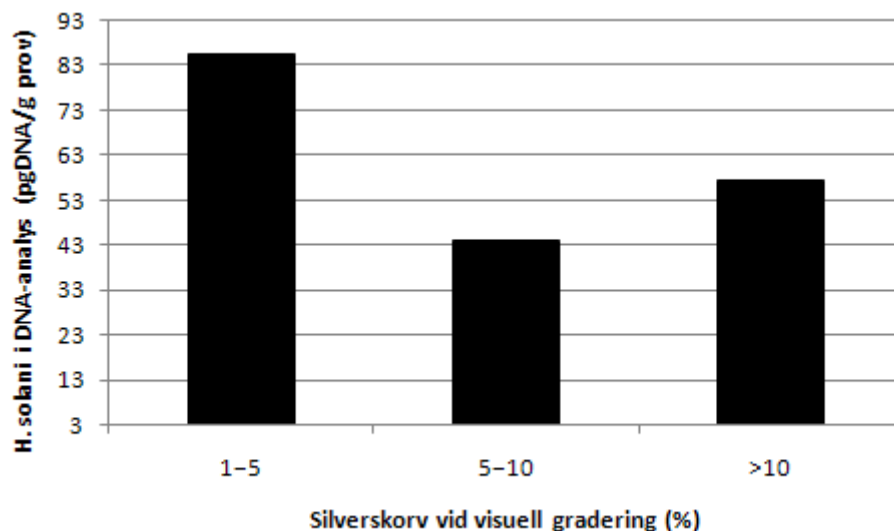


Figur 14. Förekomst av lackskorv enligt vårgradering efter lagring av knölprover. Varje symbol visar medelvärdet av fyra prov vid respektive provtagningstidpunkt. A= kontroll (obehandlad blast), B= krossning + Reglone, C = Reglone.

Pilotstudie - Metodanalys för påvisande av *H. solani*

DNA-analys

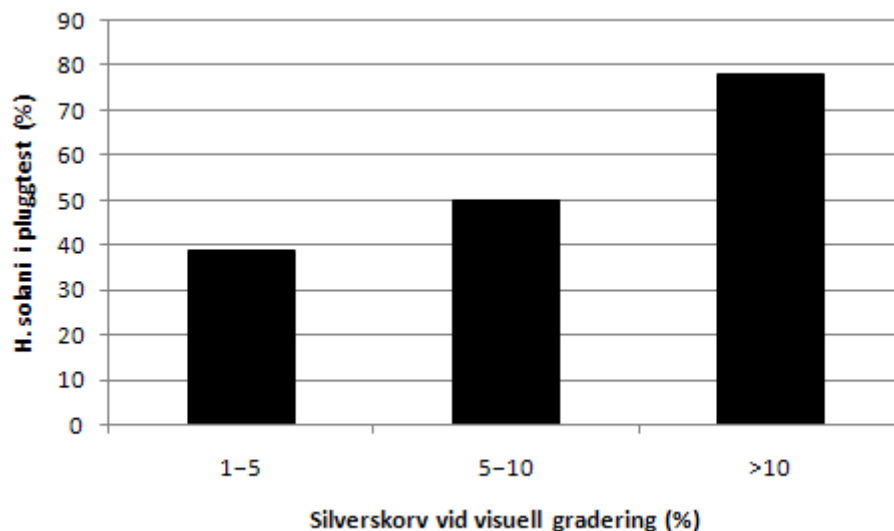
I DNA-analys avseende *H. solani* i prov från knölar med synliga symptom av silverskorv erhöles högst värden i provet från knölarna med ringa angrepp och lägst i provet med måttligt angrepp (Figur 15).



Figur 15. Jämförelse mellan visuell gradering av silverskorv med mängden *H. solani* från DNA-analys, där svarta staplar visar medelvärde av DNA-extraktioner.

Pluggtest

I pluggtestet erhöles minst *H. solani* från knölar med ringa angrepp av silverskorv och mest *H. solani* från knölar med rikligt angrepp, medan medelinfekterade intog en mellanposition (Figur 16).



Figur 16. Jämförelse mellan visuell gradering av silverskorv med procentuell andel infekterade pluggar av *H. solani* från pluggtest.

DISKUSSION

Silverskorv, *H. solani*

Förekomsten av silverskorv var mycket låg under hela provtagningsperioden. Det gick således inte att demonstrera den ökning med tiden efter blastdödning som kunde förväntats i enlighet med franska undersökningar (Jouan *et al.* 1974). I de förberedande diskussionerna om val av sort och fält låg tyngdpunkten på denna patogen eftersom silverskorv är vanligt förekommande i potatisodlingar och betraktas som en allvarlig skadegörare, inte bara på denna gård. Bytet av försöksplats på grund av översvämningsskadorna gjorde att denna studie kom att få en något annan vinkling än den ursprungligen planerade. Enligt Wiklund² finns flera andra potatispartier från skörden 2009 med silverskimrande fläckar. En bidragande anledning till lågt silverskorvsangrepp på fältets knölar kan vara att sorten är synnerligen mottaglig för *R. solani* och mindre känslig för silverskorvangrepp samt att den extrema väderleken gynnat *R. solani*. Den kraftiga infektionen av *R. solani* kan också ha resulterat i begränsat livsutrymme för silverskorv.

² Andreas Wiklund växtodlingsansvarig Stora Tollby Gård, telefonsamtal den 19 jan 2010.

Svartpricksjuka, *C. coccodes*

Förekomsten av svartpricksjuka var också tämligen låg under hela provtagningsperioden. Trots detta visade både pluggtest och DNA-analys på en ökning av svartpricksjuka med tiden efter blastdödning. Detta är mig veterligt första gången ett sådant resultat rapporteras, varför studien har ökat kunskapsläget om denna patogen. Det är inte uteslutet att Wiklunds observationer, se ovan, om silverskimrande fläckar på partier i lagret kan bero på svartpricksjuka och inte silverskorv. Även om infektionen av svartpricksjuka var låg indikerar Figur 20 att det inte förekommer någon antagonistisk interaktion mellan *R. solani* och *C. coccodes*, då patogenerna förekommer tätt tillsammans på samma knöl. Svartpricksjuka och silverskorv påstås däremot konkurrera om livsutrymme på knölens yta, där minskning av den ena leder till ökning av den andra (Hide & Hall 1993).

Lackskorv, *R. solani*

Förekomsten av lackskorv var mycket riklig redan vid första provtagningen fyra dagar före blstdödning. Därefter ökade förekomsten ytterligare med stigande blstdödningsintervall vilket stämmer väl överrens med tidigare rapporter (Gudmestad *et al.* 1979; Otrysko *et al.* 1988; Spencer & Fox 1978, 1979). I denna studie tog det dock endast två till tre veckor innan skörden var totalinfekterad, medan man under mera normala omständigheter, med lägre utgångsvärde, borde ha kunnat registrera en ökning av lackskorv under hela försöksperioden.

Vårgraderingen visade att de olika blstdödningsmetoderna påverkade förekomsten av lackskorv. De två kemiska behandlingarna gav likartad utveckling, medan det dröjde nästan fem veckor innan angreppen i kontrolleret nådde samma omfattning. Hypotesen att den kemiska blstdödningen skulle påskynda utvecklingen av lackskorv, vilket tidigare rapporterats ske efter behandling med såväl Reglone (Otrysko *et al.* 1988) som svavelsyra (Spencer & Fox 1978, 1979) eller det numera förbjudna ogräsmedlet Dinoseb (Dijst 1985), kunde därigenom verifieras. I enlighet med de utländska studierna är det sannolikt att större skillnader mellan behandlingar uppträtt om försöket startats tidigare i en mera omogen gröda med en lägre smittonivå.

Orsaken till det kraftiga lackskorvsangreppet beror troligen på flera samverkande faktorer. Utsädet hade betats, varför smittan sannolikt kom från marken, ett antagande som styrks av den ensidiga växtföljden med potatis på fältet vartannat år. Samstämmiga studier från olika länder visar att risken för marksmitta av *R. solani* är mycket stor om fältet inte varit fritt från potatis i två år eller mer (Bång 2008; Carling *et al.* 1986; Hide & Read 1991). En annan faktor är den rikliga nederbörden under odlingssäsongen som misstänks har lakat ut kvävet ur marken vilket har påskyndat grödans avmognad. Bildandet av lackskorv på knölarna initieras i samband med att skalet börjar mogna och avge sklerotiestimulerande exudat (Dijst 1985, 1990) och detta har därigenom skett tidigare på säsongen. Dessutom bildar sorten Ampera skal tidigt, vilket i enlighet med ovanstående gör den mycket mottaglig för lackskorv då smitta av *R. solani* finns närvarande.

DNA-analys

DNA-analys utfördes genom homogenisering av potatisskal, extrahering av patogen-DNA och kvantifiering av patogenerna med QPCR. Syftet var att utreda om denna metod är användbar för att tidigt kunna bestämma svamparnas smittonivåer i potatisskörden. Analyserna gav varierande och därigenom opålitliga svar. I pilotstudien med olika grader av synliga angrepp av *H. solani* fanns ingen korrelation till QPCR-analysernas värden, medan pluggtestens resultat däremot väl speglade okulärbesiktningen. I blstdödningsstudien fanns ingen trend i analysresultaten med QPCR för *C. coccodes* och *R. solani* och överensstämmelsen med pluggtestresultaten var svag för den förstnämnda och obefintlig för den sistnämnda.

Replikaten från samma DNA-extraktionsprov visade god överensstämmelse i QPCR-analyserna, vilket verifierar att analystekniken fungerar korrekt. Problemet med opålitliga svar kan däremot till viss del härledas till variationen som förekom mellan de dubbla

extraktionsreplikaten a och b som skilde sig signifikant i de flesta fall. De stora skillnaderna berodde troligtvis på brister i homogeniseringen av potatisproverna och extraheringen av patogen-DNA. Homogeniseringen av potatisskalen utfördes inte på samma sätt som i metoden beskriven av Cullen *et al.* (2001). Skillnaden var att skaln frystorkades och krossades i kulkvarn istället för att malas i mortel tillsammans med flytande kväve. Möjligen blir proven mer homogena om tekniken med mortel och flytande kväve används. Vid DNA-extraktionen kördes inte de homogeniserade proven i "beadbeater" som homogeniserar proven ytterligare genom kraftig skakning. Beadbeater användes inte p.g.a. problem med överskumning när proven kördes i värmeblock. Sannolikt blev därför proven inte helt homogena, vilket gav upphov till variationerna mellan de dubbla extraktionerna. Överskumningen beror på potatisstärkelse som följer med från potatisen i samband med skalning av knölarna. Problemet med överskumning kan eventuellt minskas genom att skala mycket tunna skal. En annan orsak till dålig överensstämmelse mellan resultaten från QPCR och pluggtest kan bero på att den senare metoden baseras på registreringar från 15 knölar, medan skalremсор från endast ett mindre antal knölar analyserades med QPCR. En mera korrekt jämförelse hade skett om alla skalremсор från provet hade frystorkats och homogeniserats mycket noggrant innan prov till DNA-extraktion togs ut.

För alla detektionsmetoder som ska användas i prognostiserande syfte är det givetvis nödvändigt att provet är representativt. För att kunna ta ett representativt prov måste man ha god kännedom om patogenens spridningsbiologi och ha vissa kunskaper i statistik så att ett tillräckligt stort prov av knölar tas vid rätt tidpunkt. Detta gäller givetvis också för DNA-baserade metoder där sedan homogeniseringen av provet är av yttersta vikt eftersom endast en ytterst liten mängd används för extraktion av DNA. Risken för missvisande resultat är annars överhängande om inte ett stort antal delprov analyseras och resultaten sammanvägs.

STUDIE II, Drycore-symptom; Samband mellan knäpparlarver och *Rhizoctonia* och effekt av olika betningsmedel

MATERIAL OCH METODER

Fältdata, försöksplan och provtagning

Ett fält hos en odlare på Gotland med förväntad stor förekomst av knäpparlarver valdes till studien under 2009. Fältdata beskrivs i Tabell 4. Sorten King Edvard valdes på grund av dess känslighet mot angrepp av svampen *R. solani*.

Tabell 4. Fältdata

Gård	Skogs Gård (Hejde)
Gröda	Potatis
Sort	King Edvard
Sättdatum	12 maj 2009
Förfrukt	Potatis
Förförfrukt	5-årig vall
Jordart	Något mullhaltig Mo

Utsädet var ett lackskorvsmittat parti som betades med fyra olika produkter, tre syntetiska pesticider och ett biologiskt medel (Tabell 5). Pesticiderna var Monceren, Prestige och Gaucho (Bayer, Staffanstorp, Sverige). Sättnöarna betades genom att de placerades i nätsäckar och doppades i brukslösning av respektive betningsmedel (se konc. i tabell 5) under två minuter. Därefter fick de betade nöarna torka. Det biologiska betningsmedlet var Proradix (Organox AB, Stockholm, Sverige) som pudrades på sättnöarna och i sättnöarna i samband med sättnöing.

Tabell 5. Försöksplan

Led	Preparat	Dos	Verksam substans/organism
A	Obehandlat	-	-
B	Monceren FS 250	2,5%	Pencycuron (250 g/l)
C	Prestige FS 370	2,5%	Pencycuron, 21,9, Imidaklopid, 10,5 (vikt-%)
D	Gaucho WS 70	1,1%	Imidaklopid (70 vikt-%)
E	Proradix	0,38g/knö	<i>Pseudomonas flourescens</i>

Monceren är ett kontaktverkande svampmedel mot svampen *R. solani*. Gaucho är ett insektsmedel och verkar som mag- och kontaktgift. Prestige är ett kombinerat svamp- och insektsmedel. Proradix är tillåtet i ekologisk odling och används av vissa potatisodlare i landet. Dess innehåll av naturliga jordbakterier inom släktet *Pseudomonas* ska enligt produktbeskrivningen ha tillväxtstimulerande effekt på grödan och ge större skörd och jämnare storlek på växterna. Utländska studier har påvisat positiv effekt genom biologisk kontroll av *R. solani* med *P. flourescens* som verksam organism (Brewer & Larkin 2005; Grosch *et al.* 2005; Bautista *et al.* 2007).

Fältförsöket utformades som randomiserat blockförsök med fyra upprepningar. Rutstorleken var 6 potatisrader med 6 m längd. Radavståndet var 75 cm och utsädesstorleken avgjorde sättnöavståndet.

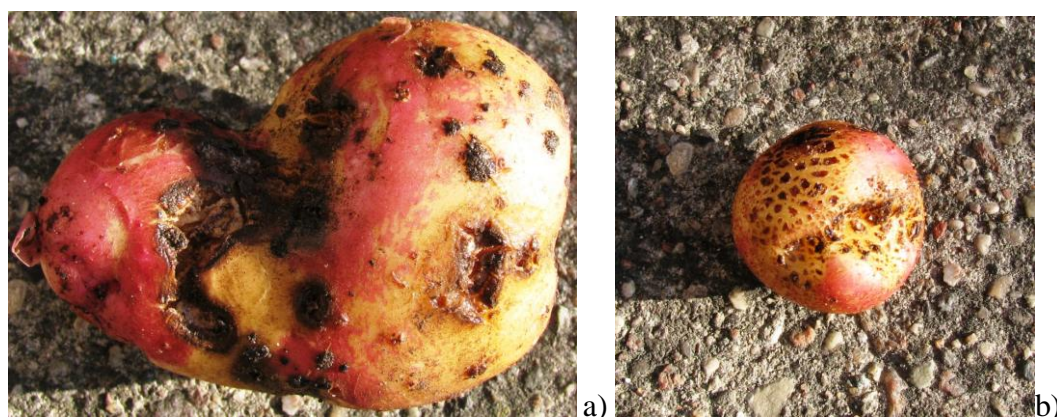
Fältet skördades den 16 september och från varje rutas två mittersta potatisrader togs ett analysprov motsvarande 10-15 kg. I samband med upptagningen vägdes samtliga nöar från varje rutas två mittersta rader.

Analys

Potatisproven storlekssorterades i fraktionerna <40 mm, 40-60 mm och >60 mm.

Mittfraktionen graderades för symptom av drycore, lackskorv, krokodilskinn, missformning och grönfärgning. Symptomen illustreras i figur 17 på nöar tagna från försöksfältet. I samtliga analyser vägdes och räknades nöarna.

Symptomet drycore graderades genom att indela nöarna i fem olika klasser (Tabell 6). Ett index beräknades, där klassvikten multiplicerades med 0, 1, 2, 3 respektive 4 och dividerades med totala vikten för provet. För verifiering av skadeorsak studerades ett 50-tal drycore-symptom i lupp, (Figur 18 och 19). I samtliga dessa fanns mycel av *R. solani* i fördjupningarna, vilka således inte enbart bestod av knäpparlarvskador.



Figur 17. Knölar från försöksfältet där a) har symptomen missformning, lackskorv samt drycore och b) har stannat i tillväxt på grund av kraftigt angrepp av *R. solani* (krokodilskinn). Foto: Stefan Brorsson

Lackskorv och krokodilskinn graderades i fyra klasser med hänsyn till procentuellt angrepp på knölens yta, enligt friska (klass 0), ringa angrepp (1-5%; klass 1), måttligt angrepp (5-10%; klass 2) och rikligt angrepp (>10%; klass 3). Ett angreppsindex räknades ut genom att vikt i respektive klass multiplicerades med 0, 1, 2, eller 3 och dividerades med totala vikten för provet. Indexvärdena för symptomen kan således anta värden från 0-4 (drycore-index) respektive 0-3 (lackskorv- och krokodilskinnindex). Missformning samt grönfärgning analyserades kvalitativt per knöl.

Tabell 6. System för gradering av knölarnas drycore-skador

Klass	Hålens antal	Hålens djup (mm)
1	Inga	0
2	1-3	1-4
3	>3	1-4
4	1-3	>4
5	>3	>4

Rutornas bruttoskörd (kg/ha) uppskattades med hjälp av det uttagna provets vikt och ytan av de två mittersta raderna (9 m²). Därefter justerades bruttoskörden efter den säljbara fraktionen 40-60 mm som utgjorde 68%.

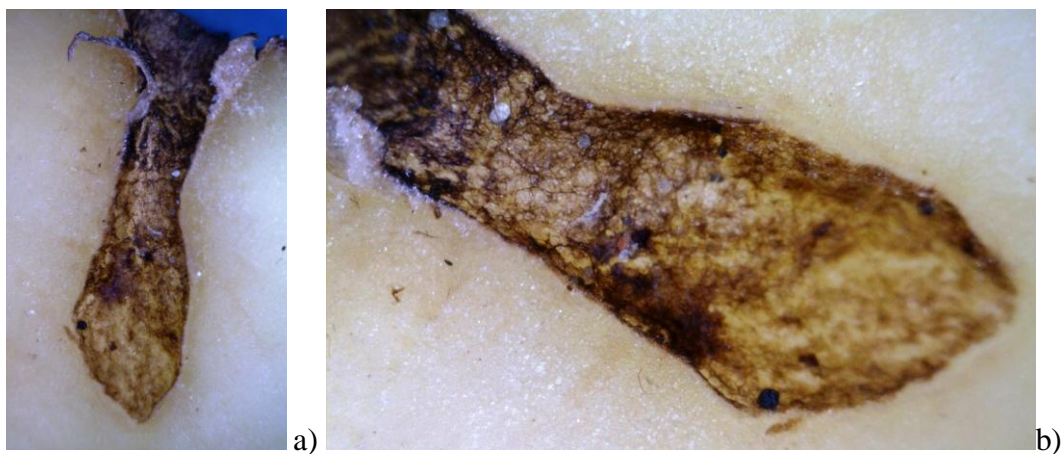
Friskskörd uppskattades baserat på bruttoskörd och friska knölar (klassen inga och ringa angrepp) från graderingen av lackskorv. Summerad vikt av friska knölar dividerades med totala vikten av provet. Andelen friska knölar multiplicerades därefter med bruttoskörden.

Statistik

För att testa om det fanns skillnader mellan behandlingarna vad gäller drycore, lackskorv, krokodilskinn, grönfärgning, missformning samt brutto- och friskskörd utfördes envägs variansanalys (ANOVA) på data i försöksled A-E. Om $P \leq 0,05$ gjordes medeltalsjämförelse med hjälp av Fisher's LSD. Programmet som användes för statistisk analys var NCSS 2007 (Number Cruncher Statistical Software, Kaysville, Utah 84037 Utah, USA).



Figur 18. Symptom av *R. solani* och knäpparlarver på potatis: a) och b) översiktsbild på drycore-skador, c) och d) närbild på drycore symptom med synligt mycel av *R. solani*. Foto: Ulla Bång



Figur 19 a) och b) visar genomskäring av drycore med synligt mycel av *R. solani* inuti hålet. Foto: Ulla Bång

Knäpparlarvfällor

Larvfällor placerades ut vid två tillfällen för att undersöka knäpparlarvförekomsten. Fällans konstruktion och utförande är med viss modifikation kopierad efter Murray *et al.* (2006). En plastkruka (Ø i botten = 15 cm) med tre hål (Ø = 1,5 cm) fylldes med vermikulit, majs och vete. Först tillsattes ett lager vermikulit (400 ml), därefter ett lager obetade majs- och vetekärnor (200 ml) och slutligen fylldes krukans upp med vermikulit. Krukan vattenmättades ett dygn innan utplacering på fältet för att stimulera groningen. Fällorna placerades 15 cm ner i sättraden och täcktes med lock (Figur 20). Markeringspinnar sattes vid varje fälla. Fyra fällor placerades ut diagonalt över försöket i två omgångar.



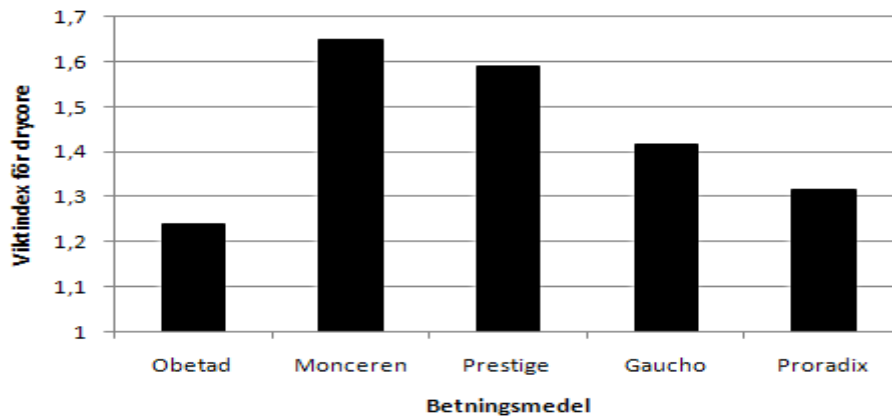
Figur 20 a) och b). Knäpparlarvfällans utplacering i försöksfältet

Första omgången fällor placerades ut tio dagar efter sättnings och togs upp efter 10 dagar. Vid upptagningen gjordes grävningar i kuporna för att undersöka larvförekomsten. Andra omgången sattes ut den 5 juni och togs upp den 17 juni. Vid två av fällorna togs även jordprover under fällorna. Fällornas och jordprovernans innehåll av knäpparlarver analyserades i lab.

RESULTAT

Drycore

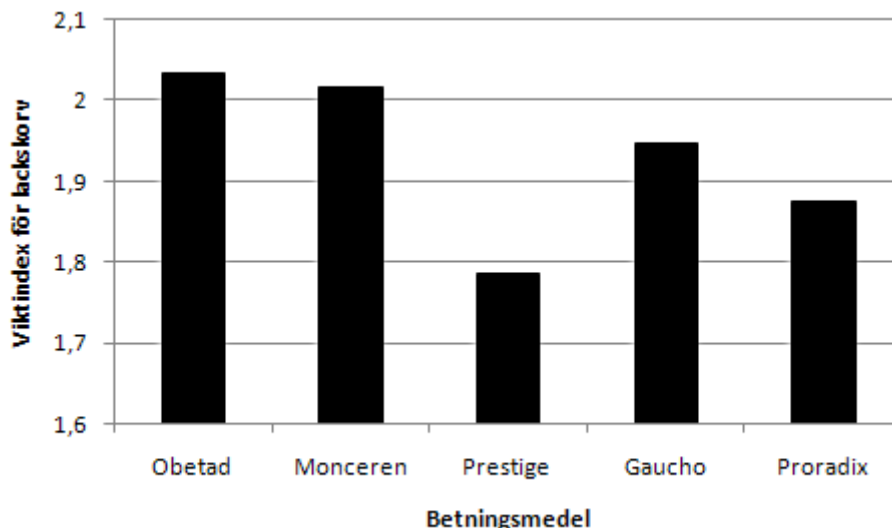
Variationsanalysen baserat på viktindex av drycore-klasserna visade inga signifikanta skillnader mellan olika behandlingar. Viktindex var lägst för obehandlat led och högst för Moncerenledet (Figur 21).



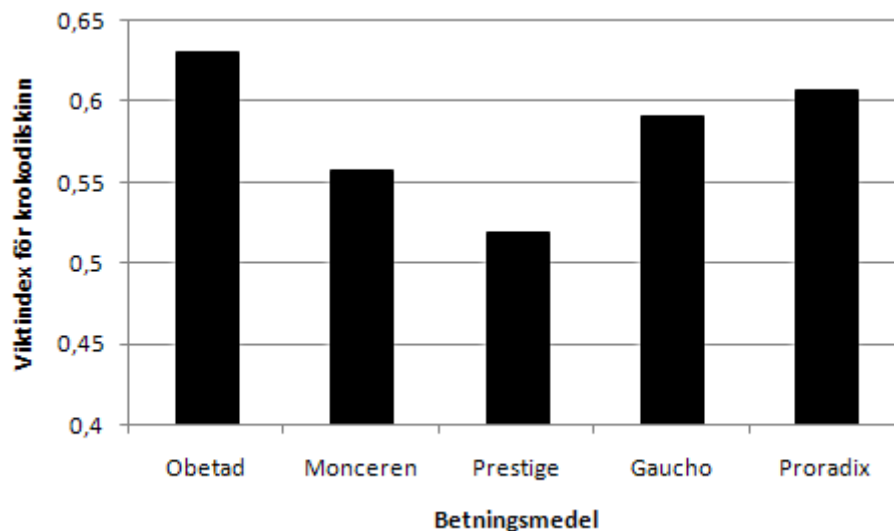
Figur 21. Förekomst av drycore och jämförelse mellan olika betningsmedel.

Lackskorv och krokodilskinn

Variationsanalysens viktindex av lackskorv- och krokodilskinnsangrepp visade inga signifikanta skillnader mellan olika behandlingar. Angreppen av lackskorv och krokodilskinn var lägst för ledet behandlat med Prestige (Figur 22 och 23).



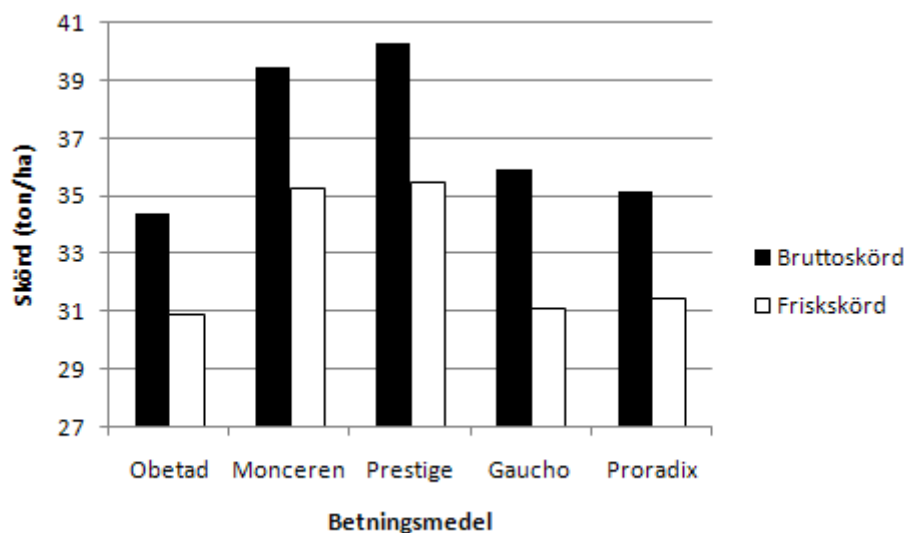
Figur 22. Förekomst av lackskorv och jämförelse mellan olika betningsmedel.



Figur 23. Förekomst av krokodilskinn och jämförelse mellan olika betningsmedel.

Brutto- och friskskörd

Bruttoskörden visade signifikanta skillnader mellan olika behandlingar ($P=0,007$). Betning med Monceren och Prestige gav signifikant högre skörd jämfört med obehandlat led, Gaucho och Proradix (Figur 24) (Fisher's LSD Comparison Test; $P \leq 0,05$, $n=4$). Enligt Fisher's test var friskskörden för Prestigeledet signifikant högre jämfört med obehandlat led och Gaucho. Friskskörden för Monceren skiljde sig signifikant från det obetade.



Figur 24. Skillnader i brutto- och friskskörd mellan olika betningsmedel.

Knäpparlarvfällor

I knäpparlarvfällorna och jordproverna hittades inga knäpparlarver. Knäpparlarver hittades däremot under enstaka fällor och vid grävningar i försöksfältet i samband med utplacering och upptag av fällorna samt vid enstaka besök i försöksfältet (Figur 25 och 26).



Figur 25 a) och b) visar penetrering av knäpparlarv i potatisknöl taget från försöksfältet på Skogs Gård (Gotland). Foto: Stefan Brorsson



Figur 26 a) och b). Knäpparlarver upphittade vid grävningar i försöksfältet. Foto: Stefan Brorsson

DISKUSSION

Utsädesbetningarna med Monceren och Prestige ledde till högre skörd jämfört med övriga behandlingar. Detta visar att produkterna kontrollerat utsädessmitta av *R. solani* och skyddat mot skördereducerande angrepp på stjälkar och stoloner. Betningen med dessa preparat hade däremot ingen signifikant effekt på knölarnas infektion av patogenen, varken avseende lackskorv, krokodilskinn eller drycore. I samtliga försöksserier vid SLU där Monceren-betning ingått har preparatet haft synnerligen god bekämpningseffekt mot alla symptom av *R. solani*, även de på knölarna. De försöken har legat på fält med bra växtföljder där potatis inte ingått de närmast föregående tre åren och risken för marksmitta därigenom varit liten (U. Bång, muntl. uppgift). De kraftiga angreppen på knölarna i detta försök härrör därför med stor sannolikhet från marksmitta vilket inte är förvånande eftersom potatis odlades där året innan. Marksmitta påstås oftast inte orsaka särskilt allvarliga symptom på stoloner och stjälkar medan däremot knölarna anses löpa större risk att angripas eftersom de har kontakt med en betydligt större mängd jord. I extrema fall, i potatistäta växtföljder, har mycket höga nivåer av marksmitta dock även orsakat kraftiga angrepp av groddbränna (U. Bång, muntl. uppgift).

Ett mål med denna studie var att försöka påvisa orsakssambandet mellan knäpparlarver och *R. solani* för utveckling av symptomen drycore. Det blev dock omöjligt att kvantifiera

förekomsten av knäpparlarver eftersom inga larver hittades i fällorna. Förmodligen har de inte haft möjlighet att ta sig in i fällorna på grund av tätt nätverk av rötter som växt inuti krukan och täppt igen bottenhålen. Knäpparlarver fanns dock bevisligen i fältet eftersom de hittades under fällorna och vid handgrävningar. I detta fält med knäpparlarver och smitta av *R. solani* förekom drycore. I projektets andra studie på Stora Tollby gård, som hade liknande odlingsmässiga förutsättningar och kraftiga angrepp av *R. solani*, fanns ingen drycore. Där hittades inte heller några knäpparlarver i försöksfältet. Resultaten stöder det visade sambandet (Keiser 2007) att både *R. solani* och knäpparlarver behövs för att drycore ska uppstå. Däremot stöds inte tidigare rapporter som visat att *R. solani* också kan invadera knölarna via lenticeller som öppnat sig vid kraftigt blöta förhållanden och ge drycore-liknande symptom (Schwinn 1961). Hade så varit fallet borde drycore ha förekommit även i försöksfältet på Stora Tollby eftersom säsongen präglades av mycket kraftig nederbörd i juli och blöta förhållanden i slutet av odlingssäsongen.

Betningen med det biologiska preparatet Proradix gav samma skörd som kontrollen och var således inte verksamt mot *R. solani* i detta försök. Insektspreparatet Gaucho hade ingen uppenbar reducerande effekt på förekomsten av drycore, men det är svårt att veta om populationen av knäpparlarver reducerades något eftersom fällorna inte fungerade. Eftersom det förekom marksmitta av *R. solani*, vilken inte reduceras genom betning av utsädesknölarna, och Gaucho inte verkar vara särskilt effektivt mot knäpparlarver, ger försöket inte någon vägledning om möjliga bekämpningsstrategier mot drycore.

Båda studierna bevisar att betning av utsädet ger liten, eller ingen bekämpningseffekt mot angrepp av lackskorv då *R. solani* förekommer som marksmitta, till exempel i de fall då potatisen ofta ingår i växtföljden.

TACK TILL

Ulla Bång, Huvudhandledare, Inst. för Norrländsk jordbruksvetenskap, SLU, Umeå.

Gunnel Andersson, Biträdande handledare, Växtskyddscentralen, Kalmar.

Sten & Ann Wikström samt Andreas Wiklund, Stora Tollby Gård, Gotland, för bidrag med fältförsöksplats, praktiska fältförsöksåtgärder samt gårdslagring av fältförsöksknölar.

Peter Hansson, Skogs Gård, Hejde, Gotland, för bidrag av fältförsöksplats i studie II.

Bo Pettersson, Försöksledare, Hallfreda försöksstation, Hushållningssällskapet, Gotland, för utförande av praktiska fältförsöksåtgärder samt utlåning av lokaler och fältmaterial.

Dan Funck Jensen, Professor, Inst. för skoglig mykologi och patologi, SLU, Uppsala, för bidrag med laborationsmaterial och lokaler för utförande av DNA-analys i studie I.

Fredrik Heyman, Forskare, Inst. för skoglig mykologi och patologi, SLU, Uppsala, för praktiska råd om utförandet av DNA-analys i studie I.

Rena Gadjeva, Forskningsingenjör, Inst. för skoglig mykologi och patologi, SLU, Uppsala, för hjälp med utförandet av DNA-analys i studie I.

Shusheng Zuo, Forskare, Inst. för skoglig mykologi och patologi, SLU, Uppsala, för hjälp med utförandet av DNA-analys i studie I.

Malin Barrlund, Försökstekniker, Inst. för Norrländsk jordbruksvetenskap, SLU, Umeå, för utförande av biologiska analyser (studie I och II) samt demonstration av analysutförandet.

Lars Wallgren, Institutionstekniker, Inst. för Norrländsk jordbruksvetenskap, SLU, Umeå, för utförande av biologiska analyser i studie I och II.

Ann-Sofi Hahlin, Forskningsingenjör, Inst. för Norrländsk jordbruksvetenskap, SLU, Umeå, för praktiska råd i studie I.

SLF, Stiftelsen Lantbruksforskning, Bayer CropScience och Jordbruksverket, som bidragit med FoU-medel.

REFERENSER

- Andersson B (2001). Lackskorv, groddbränna och filtsjuka på potatis. *Faktablad om växtskydd – jordbruk* 28J. Inst. för ekologi och växtproduktionslära, SLU.
- Bautista G, Mendoza H & Uribe D (2007). Biocontrol of *Rhizoctonia solani* in native potato (*Solanum phureja*) plants using native *Pseudomonas fluorescens*. *Acta Biologica Colombiana* **12**, 19-32.
- British Potato Council (1998). Quality. *Eyewitness* **1**, 13. Citerat i: Lees A.K. & Hilton A.J. (2003) Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. *Plant Pathology* **52**, 3-12.
- Brewer M T & Larkin R P (2005). Efficacy of several potential biocontrol organisms against *Rhizoctonia solani* on potato. *Crop Protection* **24**, 939-950.
- Bång U (2001). Silverskorv och svartpricksjuka på potatis. *Faktablad om växtskydd – jordbruk* 19J. Inst. för norrländsk jordbruksvetenskap, SLU.
- Bång U (2005). Marksmitta av *Rhizoctonia*. *Viola, Potatis och Grönsaker*, september, nr 3, 24.
- Bång U (2008). ”Dry core” – ett av *Rhizoctonia*s många ansikten. *Viola, Potatis och Grönsaker*, december, nr 24, 26-27.
- Carling D E, Leiner R H & Kebler K M (1986). Characterization of *Rhizoctonia solani* and binucleate rhizoctonia-like fungi collected from Alaskan soils with varied crop histories. *Canadian Journal of Plant Pathology* **8**, 305-310.
- Cullen D W, Lees A K, Toth I K & Duncan J M (2001). Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant pathology* **107**, 387-398.
- Cullen D W, Lees A K, Toth I K & Duncan J M (2002). Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR. *Plant Pathology* **51**, 281-292.
- Dijst G (1985). Investigations on the effect of haulm destruction and additional root cutting on black scurf on potato tubers. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **91**, 153-162.
- Dijst G (1990). Effect of volatile and unstable exudates from underground potato plant parts on sclerotium formation by *Rhizoctonia solani* AG-3 before and after haulm destruction. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **96**, 155-170.
- Glais I & Andrivon D (2004). Deep sunken lesions – an atypical symptom on potato tubers caused by *Colletotrichum coccodes* during storage. *Plant Pathology* **53**, 254.
- Grosch R, Faltin F, Lottmann J, Kofoet A & Berg G (2005). Effectiveness of antagonistic bacterial isolates to control *Rhizoctonia solani* Kuhn on lettuce and potato. *Canadian Journal of Microbiology*, **51**, 345-353.

- Gudmestad N C, Zink R T & Huguelet J E (1979). The effect of harvest date and tuber-borne sclerotia on the severity of *Rhizoctonia* disease of potato. *American Potato Journal* **56**, 35-41.
- Hide G A & Boorer K J (1991). Effects of drying potatoes (*Solanum tuberosum* L.) after harvest on the incidence of disease after storage. *Potato Research* **34**, 133-137.
- Hide G A & Hall S M (1993). Development of resistance to thiabendazole in *Helminthosporium solani* (silver scurf) as a result of potato seed tuber treatment. *Plant Pathology* **42**, 707-14.
- Hide G A, Hirst J M & Salt G A (1968). Methods of measuring the prevalence of pathogenic fungi on potato tubers. *Annals of Applied Biology* **62**, 309-318.
- Hide G A & Read P J (1991). Effects of rotation length, fungicide treatment of seed tubers and nematicide on diseases and the quality of potato tubers. *Annals of Applied Biology* **119**, 77-87.
- Jouan B, Lemaire J M, Perennec P & Saily M (1974). Etudes sur al gale argent, e de la pomme de terre *Helminthosporium solani* Dur. et Mont. *Annals of Phytopathology* **6**, 407-423.
- Keiser A C (2007). Influence of farming system, specific cultivation, methods and site parameters on potato quality. Akad.avh. ETH No. 17135.
- Langerfelt Von E (1985). *Colletotrichum coccodes* (Wallr.) Hedges, ein nicht genügend beachteter Erreger von Schäden an Kartoffeln. *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd.* (4) **37**, 49-53.
- Lees A K & Hilton A J (2003). Black dot (*Colletotrichum coccodes*): an increasingly important disease of potato. *Plant Pathology* **52**, 3-12.
- Lees A K, Cullen D W, Sullivan L & Nicolson M J (2002). Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. *Plant Pathology* **51**, 293-302.
- Mulder A, Turkensteen L J & Bouman A (1992). Perspectives of green-crop-harvesting to control soil-borne and storage diseases of seed potatoes. *European Journal of Plant pathology* **98**, 103-114.
- Murray T, LaGasa E & Vernon B (2006). New Wireworm Pests in Western Washington. *Sustaining the Pacific Northwest* **4**, 1-5.
- Nilsson C (1995). Knäpparlarver och knäpparlarvskador. *Faktablad om växtskydd – jordbruk* 6J. Inst. för växtskyddsvetenskap, SLU.
- Otrysko B E, Banville G J & Asselin A (1988). Influence du degré de dépendance des tudercoles-fils de pommes de terre vis-à-vis de la plantemère sur leur infestation par *Rhizoctonia solani*. *Potato Research* **31**, 617-625.
- Osowski J (2009). Black dot (*Colletotrichum coccodes*) as a new threat to potato plantation. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roslin*, 243-251.

Parker W E & Seeney F M (1997). An investigation inot the use of multiple site characteristics to predict the presence and infestation level of wireworms (*Agriotes* sup., Coleoptera: Elateridae) in individual grass fields. *Annals of Applied Biology* **130**, 409-425.

Radke W & Rieckmann W, Eds (1990). Krankheiten und Schädlinge der Kartoffel. Verlag Th. Mann, Nordring 10, D-4650 Gelsenkirchen-Buer. ISBN 3-7862-0088-2, 168pp.

Schwinn FJ (1961). Ueber die “drycore”-Krankheit der Kartoffelknolle. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz **68**, 395-406.

Spencer D & Fox R A (1978). The distribution of sclerotia of *Rhizoctonia solani* Kühn on the surface of the potato tuber. *Potato Research* **21**, 291-230.

Spencer D & Fox R A (1979). The development of *Rhizoctonia solani* Kühn on the underground parts of the potato plant. *Potato Research* **22**, 29-39.

Zeiruk V N (2009). Anthracnose – potato disease requiring attention. *Zashchita i Karantin Rastenii*, 40-41.

Internetreferenser

SCB – Statistiska centralbyrån. Hemsida [online] (2009-12-08)

Tillgänglig: http://www.scb.se/Pages/PressRelease____283666.aspx [2010-01-10]

SMHI – Sveriges meteorologiska och hydrologiska institut. Hemsida [online]

Tillgänglig: <http://www.smhi.se/klimatdata/meteorologi/nederbord> [2010-01-12]